



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 440 146 A2**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: **91101094.0**

⑮ Int. Cl. 5: **C12N 15/13, C12P 21/08**

⑭ Anmeldetag: **28.01.91**

⑯ Priorität: **01.02.90 DE 4002897
09.02.90 DE 4003880**

⑰ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
07.08.91 Patentblatt 91/32

⑱ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑲ Anmelder: **BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
W-3550 Marburg 1(DE)**

⑳ Erfinder: **Little, Melvyn, Dr.
Fritz-von-Briesen-Strasse 10
W-6903 Neckargemünd(DE)
Erfinder: Breitling, Frank Berthold
Gerbersruh 131
W-6908 Wiesloch(DE)
Erfinder: Seehaus, Thomas, Dr.
Frankfurter Strasse 51
W-6148 Heppenheim(DE)
Erfinder: Dübel, Stefan
Quinkelstrasse 24
W-6900 Heidelberg(DE)
Erfinder: Klewinghaus, Iris
Richard-Wagner-Strasse 30
W-6800 Mannheim(DE)**

㉑ Vertreter: **Klein, Otto, Dr. et al
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)**

㉒ **Herstellung und Verwendung von Genbanken synthetischer menschlicher Antikörper ("synthetische Human-Anti-Körper-Bibliotheken").**

㉓ Die Erfindung betrifft die Herstellung und Verwendung von Genbanken synthetischer menschlicher Antikörper (huAK) oder Antikörperteile, die die antigenbindende Domäne enthalten. Ausgehend von einem huAK-Gerüst in einem geeigneten Vektor werden die hypervariablen Bereiche der Antikörper cDNA durch annähernd "zufällig" ("random") zusammengesetzte Oligonukleotide gebildet. Relativ konservierte Aminosäuren in den hypervariablen Bereichen sind dabei durch die Wahl entsprechender Nukleotide während der Oligonukleotidsynthese berücksichtigt, ebenso wie das Verhältnis der eingesetzten Nukleotide zueinander so vorgegeben ist, daß ein "Nonsense"-Codon nur in höchstens jeder 89. Position zu erwarten ist. Durch Expression dieser synthetischen huAK cDNA in mikrobiellen Expressionssystemen, z.B. dem nachstehend beschriebenen Vektor pFMT in E.coli, steht somit eine synthetische huAK-Bibliothek mit einem umfassenden Repertoire zum Durchprüfen ("Screenen") mit ausgewählten Antigenen in vitro zur Verfügung.

EP 0 440 146 A2

**HERSTELLUNG UND VERWENDUNG VON GENBANKEN SYNTETISCHER MENSCHLICHER ANTIKÖRPER
("SYNTETISCHE HUMAN-ANTIKÖRPERBIBLIOTHEKEN")**

Die Erfindung betrifft die Herstellung und Verwendung von Genbanken synthetischer menschlicher Antikörper (huAK) oder Antikörperteile, die die antigenbindende Domäne enthalten. Ausgehend von einem huAK-Gerüst in einem geeigneten Vektor werden die hypervariablen Bereiche der Antikörper cDNA durch annähernd "zufällig" ("random") zusammengesetzte Oligonukleotide gebildet. Relativ konservierte Aminosäuren in den hypervariablen Bereichen sind dabei durch die Wahl entsprechender Nukleotide während der Oligonukleotidsynthese berücksichtigt, ebenso wie das Verhältnis der eingesetzten Nukleotide zueinander so vorgegeben ist, daß ein "Nonsense"-Codon nur in höchstens jeder 89. Position zu erwarten ist. Durch Expression dieser synthetischen huAK cDNA in mikrobiellen Expressionssystemen, z.B. dem nachstehend beschriebenen Vektor pFMT in E.coli, steht somit eine synthetische huAK-Bibothek mit einem umfassenden Repertoire zum Durchprüfen ("Screenen") mit ausgewählten Antigenen *in vitro* zur Verfügung.

Es wird geschätzt, daß das Immunsystem des Menschen bzw. eines Säugetiers zwischen 10^6 und 10^8 verschiedene Antikörper besitzt. Diese Zahl von Antikörpern reicht offenbar aus, um eine Immunreaktion des Körpers sowohl gegen sämtliche in der Natur vorkommende Antigene als auch gegen künstliche Antigene hervorzurufen. Wenn man weiterhin in Betracht zieht, daß oft unterschiedliche Antikörper mit demselben Antigen reagieren, wird das Repertoire an wirklich verschiedenen Antikörpern eher im Bereich 10^6 bis 10^7 anzusiedeln sein.

Bisher werden spezifische Antikörper stets ausgehend von einer Immunisierung mit dem jeweiligen Antigen erhalten, beispielsweise Injektion des Antigens in den Organismus oder Inkubation von Milzzellen *in vitro* mit diesem Antigen. Im Fall von polyklonalen Antikörpern lassen sich die Immunglobuline anschließend aus dem Serum isolieren und z.B. durch Absorptionsverfahren die spezifischen Antikörper daraus gewinnen. Monoklonale Antikörper werden aus den Zellüberständen bzw. dem Zell-Lysat von mit einzelnen B-Lymphozyten fusionierten, klonierten Milztumorzellen (Hybridomzellen) isoliert. Die oben geschilderten Verfahren sind insbesondere zur Herstellung von spezifischen Human-Antikörpern bzw. humanen monoklonalen Antikörpern nicht geeignet.

Die vorliegende Erfindung stellt sich deshalb die Aufgabe, eine allgemein gangbare Methode zur Erzeugung spezifischer humarer monoklonaler Antikörper (humAK's) oder Antikörperteile zu entwickeln, die synthetische hypervariable Domänen enthalten.

Es wurde gefunden, daß durch die Verwendung von annähernd zufällig ("random") synthetisierten Oligonukleotiden kodierend für die jeweils drei hypervariablen Bereiche der variablen Teile von schwerer oder leichter Ketten (genannt CDR1, 2 und 3 wobei CDR = "complementary determining region" bedeutet) synthetische humane Genbanken erzeugt werden können. Die synthetisierte Antikörper-DNA wurde dann, vorzugsweise nach Amplifizierung mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), bevorzugt in einen besonders dafür konstruierten Antikörper-Expressionsvektor ligiert, nämlich den Vektor pFMT.

Eine Zusammenstellung der Oligonukleotide, die für die Synthese der variablen Domänen von schweren und leichten Ketten eingesetzt werden, zeigt Tab. 1. Satz A enthält dabei weniger Einschränkungen als Satz B. Folgende Einschränkungen der Zufälligkeit bei der Synthese hypervariabler Bereiche (siehe CDR-Regionen in Tab. 4) wurden in H3, H4, H6, L2, L3 und L5 bei Satz A vorgenommen, um erstens Sequenzpositionen für bestimmte konservierte Aminosäuren zu berücksichtigen, zweitens die Zahl der Stopcodons zu reduzieren und drittens eine neue Restriktionsstelle einzubauen.

- 40 (a) Zur Verringerung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Stopcodons wurde jeweils an der ersten Stelle jedes Codons nur die Hälfte der Menge der drei anderen Nukleotide bei T vorgegeben und an der dritten Position jedes Codons wurde A weggelassen. Damit ist im statistischen Mittel nur jedes 89. Codon ein Stopcodon.
 - 45 (b) Für das 2. Codon in der CDR1-Region der leichten Kette wurden nur Nukleotide zugelassen, die für die Aminosäuren V, A oder G kodieren.
 - (c) Ebenso wurde für Codon Nr. 10 in der CDR1 Region der leichten Kette und für Codon Nr. 4 in der CDR1 Region der schweren Kette nur die Kombinationen zugelassen, die für V, I oder M kodieren.
 - (d) In der CDR3 Region der leichten Kette wurden für Codon Nr. 1 nur die Nukleotide zugelassen, die für die Aminosäure Glutamin kodieren.
 - 50 (e) In der CDR2 Region der schweren Kette werden für Codon Nr. 11 nur die Nukleotide zugelassen, die für die Aminosäure Tyrosin kodieren.
 - (f) Zweckmäßigerweise wurde zur Einführung einer Restriktionsschnittstelle für MluI an der dritten Stelle des letzten Codons in der CDR2 Region der schweren Kette ein A eingebaut.
- Vorzugsweise wurde die Zufälligkeit dieser Oligonukleotide noch weiter eingeschränkt in den Position-

nen, wo überwiegend eine oder wenig Aminosäuren vorkommen (Satz B von Tab. 1, die Einschränkungen beruhen hier auf den Tabellen von Kabat et al. (1987), Sequences of Proteins of Immunological Interest-U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Government Printing Offices). Eine Liste der entsprechenden Nukleotide und kurze Erläuterungen zu den Codonzusammensetzungen sind in Tab. 1 und den Erläuterungen zu Tab. 1 zusammengefaßt.

Nach Ligation gleicher Mengen von Oligonukleotiden H1 bis H7 bzw. L1 bis L5 werden diese in den vorbereiteten Expressionsvektor pFMT ligiert. Vorzugsweise sollte ein PCR-Schritt mit den "Primern" H1 und H8 bzw. L1 und L6 vorgeschaltet werden, um die Menge von DNA zu amplifizieren. Nach Herstellung von geeigneten Restriktionsschnittstellen mit passenden Restriktionsenzymen an den Enden der Antikörper-DNA wird die DNA in den Antikörper-Expressionsvektor pFMT in gleicher Weise wie oben ligiert (siehe Beispiele).

Der Expressionsvektor pFMT ermöglicht die Expression von Antikörper-cDNA und anschließende Sezernierung der Expressionsprodukte in Bakterien (E.coli). Das Antikörper-Operon des Plasmids enthält die Sequenzen der variablen Teile sowohl der schweren als auch der leichten Kette eines Antikörpers. Geeignete "Leader"-Sequenzen aus dem aminoterminalen Teil eines bakteriellen Proteins ermöglichen die Sezernierung der Antikörperteile. Die "Leader"-Sequenzen werden bei der Sekretion von einem bakteriellen Enzym abgespalten. Während der Sekretion der Antikörper-cDNA-Produkte assoziieren die leichten und schweren Ketten des Antikörpers (mit oder ohne angrenzende konstante Domäne). Dadurch wird ein Antikörper oder Antikörperfragment gebildet, der bzw. das eine funktionelle Antigen-Bindungsstelle enthält. Ähnliche Konstrukte für einzelne Antikörper sind auch von anderen Autoren beschrieben worden (Better et al. (1988), Science 240, 1041, und Skerras & Plückthun (1988), Science 240, 1038).

In der durch die Expression in beispielsweise E.coli entstandenen synthetischen Human-Antikörper-Bibliothek werden die gesuchten humanen Antikörper bzw. Antikörperteile durch Screenen von bakteriellen Klonen mit dem Antigen der Wahl aufgefunden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird zusätzlich eine Sequenz eingebaut, die für ein Markerpeptid kodiert, z.B. eine "TAG"-Sequenz, so daß die Expressionsprodukte mit etablierten monokonalen Antikörpern gegen das Markerpeptid (Wehland et al. (1984), EMBO J. 3, 1295) auf einfache Weise nachgewiesen werden können.

Die vorgenannten beispielhaften Formulierungen und die nachfolgenden Beispiele sollen so verstanden werden, daß sie die Erfindung erläutern, aber nicht einschränken.

Die Erfindung betrifft folglich Genbanken synthetischer huAK oder deren antigenbindenden Teile erhalten durch (1) zufällig erzeugte cDNA für die hypervariablen Regionen wobei die Zufallssequenzen durch die Punkte (a) bis (e) Satz A bzw. gemäß Tab. 1, Satz B eingeschränkt sind, (2) daran anschließend vorzugsweise einen Amplifikationsschritt dieser Zufallssequenzen und (3) Ligierung der genannten cDNA in einen geeigneten Expressionsvektor, vorzugsweise pFMT, wobei in einer bevorzugten Ausführungsform zusätzlich eine für ein Markerpeptid kodierende Sequenz eingebaut wird.

Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung o.g. Genbanken und Verfahren sowie deren Verwendung zur Isolierung von Klonen, die spezifische Antikörper bzw. deren antigenbindenden Teile sezernieren.

Die Erfindung ist schließlich in den Beispielen im einzelnen ausgeführt und in den Patentansprüchen enthalten.

Beispiele:

Beispiel 1: Herstellung eines Antikörper-Expressionsvektors

Das Plasmid pKK233-2 (Amann und Brosius, (1985) Gene 40, und Straus und Gilbert, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 2014) wurde als Basisvektor für den Aufbau des Antikörper-Expressionsvektors gewählt (Fig. 1).

Vor dem Einbau des Antikörper-Operons wurde das Plasmid mit Sall und BamHI geschnitten, die Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und ligiert. Dadurch wurden diese beiden Restriktionsstellen und die dazwischenliegende DNA entfernt. Außerdem wurde das Plasmid mit HindIII gespalten, die Enden mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt und mit BamHI-Linkern ligiert. Durch diese Operation wurde die HindIII-Restriktionsstelle entfernt und eine BamHI-Stelle insertiert. In dieses modifizierte Plasmid wurde die Antikörp r-DNA insertiert. Ein v r infact r Aufbau des Antikörper-Operons, das für eine dicistronische Antikörper-mRNA kodiert, wird in Tab. 2 gezeigt. Um die Sezernierung des Antikörpers zu ermöglichen, wurde die "Leader"-Sequenz des bakteriellen Enzyms Pektatlyase verwendet. Die "Leader"-Sequenz von diesem Enzym ist schon zur Expression und Sezernierung eines chimären Maus-Mensch-Antikörpers (Fab-Fragment, Better et al., a.a.O.) sowie des variablen Teils eines "humanisierten" Antikörpers (Ward et al.,

a.a.O.; Huse et al., a.a.O.) verwendet werden. DNA für die erste "Leader"-Sequenz (P_1 vor der schweren Kette) und die Sequenz für ein zweite Ribosomenbindungsstelle (RBS) und eine zweite "Leader"-Sequenz (P_2 vor der leichten Kette) wurden aus mehreren Oligonukleotiden synthetisiert (Tab. 3).

Antikörper cDNAs, die für die variable Regionen der schweren und leichten Ketten eines menschlichen

- 5 Antikörpers (HuVhlys bzw. HuVllys; Riechmann et al., (1988) J. Mol. Biol. 203, 825) kodieren, wurden von Dr. G. Winter (Cambridge, UK) erhalten. Die Restriktionsstellen HindIII (HuVhlys) und EcoRV (HuVllys) wurden eingeführt, um die Insertion der Antikörper-cDNA in den Expressionsvektor zu ermöglichen. Weitere Restriktionsstellen für BanII (HuVhlys) und BstEII bzw. KpnI (HuVllys) wurden eingeführt, um hypervariable Bereiche "en bloc" umzutauschen. Am Ende der HuVhlys-cDNA-Sequenz wurde ein Stoppsignal eingebaut.
- 10 Eine BanII-Stelle in der leichten Kette wurde entfernt. Diese Änderungen wurden mittels "site directed mutagenesis" in dem Bakteriophagen M13mp18 durchgeführt (Zoller und Smith, Meth. Enzymol. 100, 468-500). Die Sequenz der fertigen Antikörper-DNA ist in Tab. 4 gezeigt.

Für die Insertion der "Leader"-Sequenz P_1 (Tab. 3) wurde das modifizierte Plasmid pKK233-2 mit den Restriktionsenzymen NcoI und PstI verdaut und P_1 zwischen diesen Stellen insertiert (pKK233-2-P₁).

- 15 Weitere Klonierungsschritte bis auf den letzten Schritt wurden mit dem Plasmid pUC18 unternommen. Der Grund besteht darin, daß die Anwesenheit von einzelnen Teilen des Antikörper-Operons in dem Expressionsvektor das Wachstum des bakteriellen Wirts beeinträchtigt.

Vor der Klonierung in pUC18 mußte dessen BamHI-Restriktionsstelle entfernt werden. Nach einem Verdau mit BamHI wurden die einzelsträngigen Enden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und religiert.

- 20 Dieses modifizierte Plasmid wurde dann mit PstI und HindIII verdaut und P_2 plus RBS zwischen diesen Restriktionsstellen einligiert (pUC18-P₂). Bei dieser Operation verschwindet die ursprüngliche HindIII-Restriktionsstelle des Plasmids und eine neue HindIII-Restriktionsstelle wird eingebaut. pUC18-P₂ wurde dann mit PstI und HindIII verdaut und die DNA der schweren Kette (PstI-HindIII-Insert aus M13) wurde in diese beiden Stellen ligiert (pUC18-HP₂). Dieses Plasmid wurde dann mit EcoRV und BamHI verdaut und die DNA der leichten Kette (EcoRV-BamHI-Insert aus M13) wurde hineinligiert (pUC18-HP₂L).

Das Insert PstI-BamHI wurde dann in pUC18 umkloniert, nachdem dort zuvor die Restriktionsstellen für HindIII, BanII und KpnI entfernt wurden. Die HindIII-Restriktionsstelle wurde wie oben bei pKK233-2 entfernt, wobei die Religation aber ohne Insertion von BamHI Linkern erfolgte. Anschließend wurde das resultierende Plasmid mit SmaI und BanII verdaut und nach Auffüllen der überstehenden Enden durch T4 DNA-Polymerase religiert. Die Insertion des PstI-BamHI Restriktionsfragments ergibt pUC-HP₂L. In einer bevorzugten Ausführungsform wurde zusätzlich in den Restriktionsstellen BanII und HindIII eine "TAG"-Sequenz insertiert (Tab. 3). Die "TAG"-Sequenz kodiert für die Erkennungssequenz Glu-Gly-Glu-Glu-Phe des monokonalen Antikörpers Y1 1/2 (Wehland et al., (1984), EMBO J. 3, 1295). Durch diesen "Peptidmarker" ist das Expressionsprodukt des resultierenden Plasmids pUC-HP₂L bequem nachweisbar.

- 35 Für die Insertion von HP₂L bzw. HTP₂L in den Expressionsvektor wurden beide Plasmide mit PstI und BamHI geschnitten und das PstI-BamHI HP₂L-Insert aus pUC-HP₂L bzw. das HTP₂L-Insert aus pUC-HTP₂L wurde in das modifizierte Plasmid pKK233-2-P₁ in diese beiden Restriktionsstellen ligiert. Eine schematische Darstellung des fertigen Expressionsvektors pFMT wird in Tab. 5 gezeigt.

40 Beispiel 2: Synthese von Antikörper-DNA mit Zufallssequenzen in hypervariablen Bereichen

Eine Zusammenstellung der synthetisierten Oligonukleotiden für die Synthese der variablen Teile von Antikörper-DNA wird in Tab. 1 gezeigt. Für die Synthese der hypervariablen Regionen wurden annähernd zufällig ("random") Nukleotidsequenzen verwendet. Einschränkungen der Zufälligkeit werden in Tab. 1 erläutert. Zwei verschiedene Sätze von Oligonukleotiden wurden synthetisiert. In Satz A sind die hypervariablen Bereiche weitgehend zufällig außer den wenigen Positionen, wo fast ausschließlich bestimmte Aminosäuren vorkommen. In Satz B wurde die Zufälligkeit der Nukleotidsequenzen in den Positionen, wo überwiegend ein oder wenige Aminosäuren vorkommen, zusätzlich eingeschränkt.

- 45 Die Oligonukleotide wurden durch HPLC-Chromatographie oder Polyacrylamidgelektrophorese gereinigt und anschließend 5'-phosphoryliert.

Beispiel 3: Ligation der synthetisierten Oligonukleotide

- 55 Die Oligonukleotide in Tab. 1 wurden schrittweise auf einem Antikörper-DNA-"Template" zusammengefügt. Dafür wurde einzelsträngige M13mp18-DNA mit den Antikörper-DNA-Inserts in größeren Mengen (etwa 1mg) isoliert. Um die Antikörper-DNA vom Vektor zu trennen, wurden die Inserts an den beiden Enden mit zwei passenden Oligonukleotiden doppelsträngig gemacht und mit den Enzymen PstI und HindIII (schwere Kette) bzw. mit EcoRV und BamHI (leichte Kette) verdaut. Die Antikörper-DNA wurde dann auf

einer Agargelektrophorese gereinigt.

- Auf diesen DNA "Templates" wurden erst nur drei Oligonukleotide ligiert: H1, pH2 und pH3 (schwere Kette) und L1, pL2 und pL3 (leichte Kette), wobei H1 und L1 an ihrem 5'-Ende mit ^{32}P zuerst markiert wurden ("p" bedeutet 5'-phosphoryliert). 100pmol Mengen von jedem Oligonukleotid wurden eingesetzt. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden auf 2%igem Agarosegelen gereinigt und auf einem Sequenzgel analysiert. Die Menge wurde durch eine Radioaktivitätsmessung ermittelt. Gleiche Molmengen von pH4 und pH5 (schwere Kette) und pL4 und pL5 (leichte Kette) wurden dann an die schon ligierten Oligonukleotide auf dem jeweiligen "Template" ligiert. Diese DNA's wurden dann wie im vorhergehenden Schritt gereinigt und die Prozedur wurde mit gleichen Molmenge von pH6 und pH7 bis zum Reinigungsschritt wiederholt.
- 5 Die ligierten Oligonukleotide würden schließlich über ein denaturierendes Polyacrylamidgel gereinigt und vorzugsweise mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Alternativ bzw. um Verluste durch den letzten Reinigungsschritt zu vermeiden, wurden die Oligonukleotide direkt nach dem letzten Ligationsschritt mit PCR amplifiziert. Für die PCR wurden die "Primer" H1 und H8 (schwere Kette) bzw. L1 und L6 (leichte Kette) unter Standardbedingungen verwendet. Amplifizierte "Template" DNA wurde selektiv verdaut mit 10 KpnI (leichte Kette) bzw. mit AluI (schwere Kette). Gegebenenfalls wurde ein zweiter Amplifizierungsschritt 15 mit der PCR nachgeschaltet.

Beispiel 4: Insertion der Antikörper-DNA in das Expressionsplasmid

- 20 Die synthetisierte Antikörper-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen PstI und BanII (schwere Kette) bzw. BstEII und KpnI (leichte Kette) geschnitten. Die Banden mit dem erwarteten Molekulargewicht wurden durch Agargelektrophorese gereinigt, mit Ethanol gefällt und anschließend in den ebenso geschnittenen und gereinigten pUC-HP₂L (siehe oben) in zwei Schritten (erst die DNA der leichten Kette und dann die DNA der schweren Kette) ligiert. Das HP₂L-Insert wurde dann in die Restriktionsstellen PstI und BamHI des 25 Plasmids pKK233-2-P₁ (siehe Beispiel 1) ligiert. Entsprechendes gilt für das HTP₂L-Fragment. Die Antikörper-Bibliothek ist somit in dem Antikörper-Expressionsplasmid etabliert (Tab. 6). Der Grund für die Zwischenklonierung in pUC besteht darin, daß die Anwesenheit von einzelnen Teilen des Antikörper-Operons in dem Expressionsvektor das Wachstum des bakteriellen Wirts beeinträchtigt (siehe auch oben).

30 Beispiel 5: Expression und "Screenen" von Antikörpern in E.coli

- Kompetente E.coli werden mit pFMT-Plasmiden, die die insertierte Antikörper-DNA-Bibliothek enthalten, transfiziert, auf Agaroseplatten aufgezogen und dann mit Nitrozellulosefiltern, die mit dem gesuchten Antigen beschichtet sind, inkubiert. Nach der Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper werden die 35 aktiven Klone mit einem markierten Antikörper gegen die aus E.coli sezernierten menschlichen Immunglobuline identifiziert. In der bevorzugten Ausführungsform wird dafür der Antikörper YL 1/2 verwendet, der gegen die "TAG"-Sequenz gerichtet ist.

Legende zu Fig. 1:

- 40 Restriktionskarte des Expressionsvektors pKK233-2 (Amann und Brosius, a.a.O.).
 Ptrc bedeutet hybrider Tryptophan-lac Promotor
 RBS bedeutet Ribosomenbindungsstelle
 rrnB bedeutet ribosomales RNA B Operon
 45 5S bedeutet Gen für 5S RNA
 Vor der Klonierung von Antikörper-DNA in den Expressionsvektor wurden die folgenden Änderungen durchgeführt:
 1) Die Sall und EcoRI Restriktionsstellen wurden zusammen mit der zwischenliegenden DNA entfernt.
 2) Die HindIII Restriktionsstelle wurde in eine BamHI Restriktionsstelle umgewandelt.
- 50

TAB. 1

Oligonukleotide für die Synthese einer Bibliothek von Antikörper-DNA (variable Teile)

5	Satz A
H1	5'CCAGGTCCACTGCAGGRGAGCGGTCCAGGCTTGTGAGACCTAG3'
H2	5'CCAGACCTGAGCCTGACCTGCACCGTG3'
10	H3 5'TGTCTGGCTTCACCTTCAGC [T1/2 TT] CTTT1/2TTTGGGTGCCAGCCACCTGGAC3'
	C C CC A CC CC A AG G AA AG G G 3 GG G
15	H4 5'GAGGTCTTGAGTGGATGGT [T1/2TT] TAT [T1/2TT] T1/2TACGGTGAATGCTGGTAGC3'
	C CC C CC C C A AG A AG A A G G 10 G G 5 G G
H5	5'ACCAAGCAAGAACCAAGTTAGCCTGCCGCTCAGCAGCGTGACAGC3'
20	H6 5'CGCCGACACCGCGGTCTACTACTGTGCCGC [T1/2 TT] TGGGTCAAGGCT3'
	C CC C CC A AG A AG G G 10
H7	5'CCCTCGTCACAGTCCTCTCA3'
25	H8 5'CTGTGACGAGGCTGCCCTGACCCCC3'
L1	5'GCGCCAGCGTGGGTGACAGG3'
30	L2 5'GTGACCATCACCTGTT1/2TTGTT [T1/2TT] CTTT1/2TTTGGTAACAGCAGAACCCAGGT3'
	C CC CC C CC A CC CC A AG GA A AG G AA AG G G G G G 7 GG G
L3	5'AAGGCTCCAAGCTGCTGATCTAC [T1/2TT] GGTGTGCCAAGCCGTTCAAGGGTAGCGGT3'
	C CC C CC A AG A AG G G 7
35	L4 5'AGCGGTACGGACTTCACCTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGAC3'
L5	5'ATCGCCACCTACTACTGCGAG [T1/2TT] TTGGGCCAAGGTAC3'
	C CC C CC A AG A AG G G 8
40	L6 5'CCACCTTGGTACCTTGGCCGAA3'
45	
50	
55	

Satz B

H1, H2, H5, H7 und H8 bzw. L1, L4 und L6 sind identisch mit denen in Satz A

5 H3 5' TGCTGGCITCACCTTCAGC AC10%T95% TT20%C TC20%G T5% TA20% T2% T5% T70%
 C C GA45%A5% C10% GG80% A85% G80% C28%A75%G30%
 G45% A70% G10% A50%G20%
 G20%
 TGGGTGCGCCAGCCACCTGGAC3'

10 H4 5' GAGGTCTTGAGTGGATTGGT T14.5%TT AT90%C T14.5%TT T5% T10%T70% T14.5%TT
 C28.5%CC G10% C28.5%CC C70%C80%G30% C28.5%CC
 A28.5%AG A28.5%AG A20%A10% A28.5%AG
 G28.5%G G28.5%G G5% G28.5%G
 AAT A15%A20%C ACT AT16%A A70%C10%C TAT A80%C20%C CCC AC10%C T40%TC C5% T5% G
 GG G85%G80% GA C80% G30%A70% A G20%A60% GAA A40%A C20% A90%A90%
 G A4% G20% G20% G50% G40% G5% G5%
 A20%A10%T CGCGTGACAAATGCTGGTAGAC3'
 G80%G90%

15 H6 5' CGCCGACACCGCGGTCTACTACTGTGCGGC T1/2 TT GC25%C TATTGGGTCAAGGGCT3'
 C CC A75%
 A AG
 G G 8

20 L2 5' GTGACCATCACCTGT CAA T30%CG AGT C75%AA T30%T10%C C10%T40%T90%
 AG G70% A10% C10%C30% A50%C10%A10%
 G15% A30%A60% G40%A10%
 G30% G40%
 A70%T20%T70% C5% T5% T90% T90%T10%C C70%TA20% AC40%T TGGTAAACAGCAGAACGCCAGGT3'
 G30%A40%A30% A90%C20%A10% C2% C5% A20% G80% GA40%
 G40% G5% A40% A6% A85% G10% G20%
 G35% G2%

25 L3 5' AAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTAC T14.5%TT A40%T20%T AC5% C AC20%T70% CTA
 C28.5%CC G60%C70% A10% A60%A30% G
 A28.5%AG A7% G85% G20%
 G28.5%G G3%

30 L5 5' ATGCCACCTACTACTGC CT10%A CT20%T10% T60%C30%G T35%T5% T T15%T5% C
 A90% A80%G90% A10%G70% C5% C20% C10%C20%
 G30% A40%A50% A60%A75%
 G20%G25% G15%
 T14.5%TT CT15%G90% T14.5%TT ACGITCGGCCAAGGTAC
 C28.5%CC C70%A10% C28.5%CC
 A28.5%AG A15% A28.5%AG
 G28.5%G G28.5%G

Erläuterungen zu Tab. 1

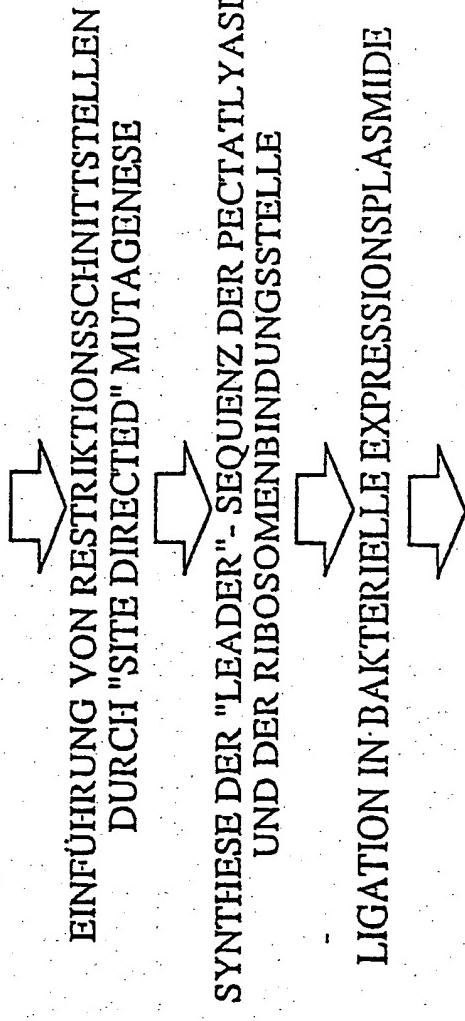
50

Die Zufälligkeit der Satz B Oligonukleotide wurde in einer Weise eingeschränkt, die annähernd die relative Menge von häufigen Aminosäuren in jeder Position der hypervariablen Regionen erzeugt (nach den Tabellen von Kabat et al., a.a.O.). Bei dieser Strategie wurde auch die Zahl der erwarteten Stopcodons noch weiter reduziert. Eine Restriktionsstelle für MluI wurde im Gegensatz zu den Satz A-Oligonukleotiden nicht eingeführt.

TAB. 2

KONSTRUKTION DES VECTORS pFMT ZUR EXPRESSION
UND SEKRETION VON ANTIKÖRPERN IN BAKTERIEN

DNA DER VARIABLEN DOMÄNE EINES HUMANEN LYSOZYM-ANTIKÖRPERS



P/O: Promotor/Operator, RBS: Ribosomenbindungsstelle, P2: "Leader"-Sequenz der Pectatlyase,
VII: Variable Domäne der schweren Kette, VL: Variable Domäne der leichten Kette

TAB. 3

5 Sequenzen der "Leader"-Sequenzen P1 und P2 im Antikörper-Operon sowie der "TAC"-Sequenzen

PI

Leadersequenz von Pekaryase (P1)

10 M K Y L L P T A A A G L I L L A A Q P A M A Q V Q L Q
CTGAAATCCTCTTCCCAAGGGCAACCGCTGGCTTGCTTCCTGGCTTCAAGCTTACGCCCGGCGATTCGGCAAGTCAGTCAGCTGG(G)
PstI

PstI

P2

303

Leadersequenz von Peknadyase (P2)

M A Y L L P T A A A

(C)TCCAGCCAGCTG
PstI HindIII

ECCBY MFG.

Die Nukleotide in Klammern sind die anwesenden Nukleotide des Plasmids.

25

Die "Leader"-Sequenzen wurden durch die Hybridisierung der folgenden Oligonukleotide synthetisiert.

PI

P2

- a. 5'GCCAGCTGATTCATTAAGGGGAA3'
b. 5'TTACTCCATGAGTACTCTGCGACCGTCGG3'
c. 3'ACGTGGTTGACTTMAAATTCTCCCTTAAATGGGTTCTGAAAGGGGCGGGGCGGGGGCGGCGGG
CGGAGACCGGGGAGTCGGGGGAACCGGAAACCGGAGCGGCGGG3':
d. 5'GCTAGCCGGGTAATGTTGTTGGG3'
e. 5'GCGATCTCAGCTTGGG3'

45 Die TAG-Sequenzen wurden durch die Hybridisierung der folgenden Sequenzen synthetisiert:

- b. 5' CCTTGATCAGCTATCCGAGGTGAGAATCAJ'

b. 5' AGCTTGGATTCCTTCCCGCTTCCGATCTGCTGAGGCC

50

55

TAB. 4

Nukleotidsequenzen von Antikörper-DNA

a) Schwere Kette (variable Domäne), HuVHlys HindIII.....

..... G V E S Q V Q L Q E S G P G L V R. 10
 CTCCTCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCACTGCAGGAGAGCGGGTCCAGGTCTTGTGAGA

PstI

..... P S Q T L S L T C T V S G F T F S [V/G//Y//G] 20 30 CDR1
 CCTAGCCAGACCCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGCTGGCTTCACCTCAGCGGGTATGGT
 BspMI

[V/N] W V R Q P P G R G L E W I G [M/I/W/G] 40 50
 GTAACTGGGTGAGACAGCCACCTGGACGAGGTCTTGAATGGATTGATTTGGGGT

CDR2 60 70
 D/G/N/T/D/Y/N/S/A/L/K/S R V T M L V D T.
 CATGCCAACACAGACTTAATTCAAGCTCTCAAATCCAGAGTGAACATGCTGGTAGACACC

80 90
 S K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y
 ACCAAGAACCACTGTCAGCCTCAGACTCAGCAGCGTCAAGCCGGGACACCGCGGTCTAT SacII

100 CDR3 110
 Y C A R [E/R/D/Y/R/L/D/Y] W G Q G S L V T
 TATTGTGCAAGAGAGAGAGATTATAGGCTTGACTACTGGGTCAGGGCTCCCTCGTCACA BanII

.V S S Stop
 GTCTCCTCATAGCTTCTTACAAACCTCTCTTCTATTCAAGCTTAA..... BamHI
 HindIII

b) Leichte Kette (variable Domäne), HuVHlys HindIII.....

..... G V E S D I Q N T Q S P S S L S A. 10
 CTCCTCACAGGTGTCCACTCCCGATATCCAGATGACCCAGAGCCAGCCCTGAGCGCC

EcoRV

..... S V G D R V T I T C [R/A/S/G/N/I/E/H/Y/L] 20 30 CDR1
 ACCGTTGGGTGACAGGGTGACCATCACCTGAGGCCAGCGGTAAACATCCACACTACCTG BstEII

40 50 CDR2
 [A/A] W Y Q Q K P G K A P K L L I Y [V/Y/T/T/T]
 GCCTGGTACCAAGCAGAACCCAGGTAGGCTCCAAAGCTGCTGAGCTACTACCCACCCACCC

60 70
 [L/A/D] G V P S R F S G S G S G T D F T F
 CTGGCTGACGGTGTGCCAGCAGATTCAAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTTC

80 90 CDR3
 .T I S S L Q P E D I A T Y Y C [Q/E/F/W/S]
 ACCATCAGCAGCCCTCCAGCCAGGGACATGCCACCTACTACTGCCAGCATTCTGGAGC

100
 [T/P/R/T] F G Q G T K V E I K R.E Stop
 ACCCCAGGACGGTTCGGCCAGGTACCAAGGTGGAAATCAACGTGAGTGAATTTAAC

60 KpnI
 TTGCTTCCCTCAAGTGGATCC
 BamHI

5

10

15

20

25

30

35

40

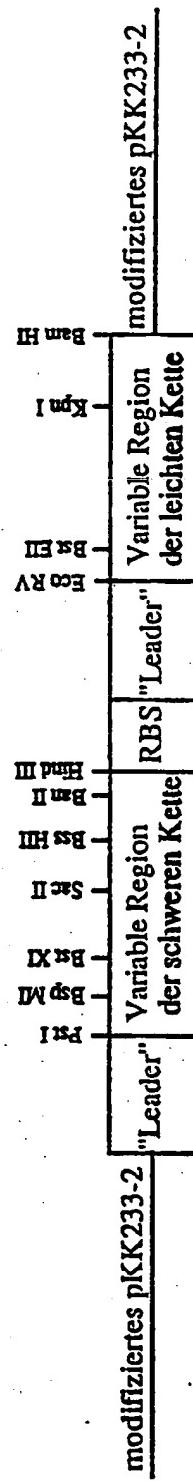
45

50

55

TAB. 5

Das Antikörper- Expressionsplasmid pFMT



Eine RBS ist vor dem Schwerketten teil im Plasmid vorhanden und nicht nochmals eingezeichnet.

5

10

15

20

25

30

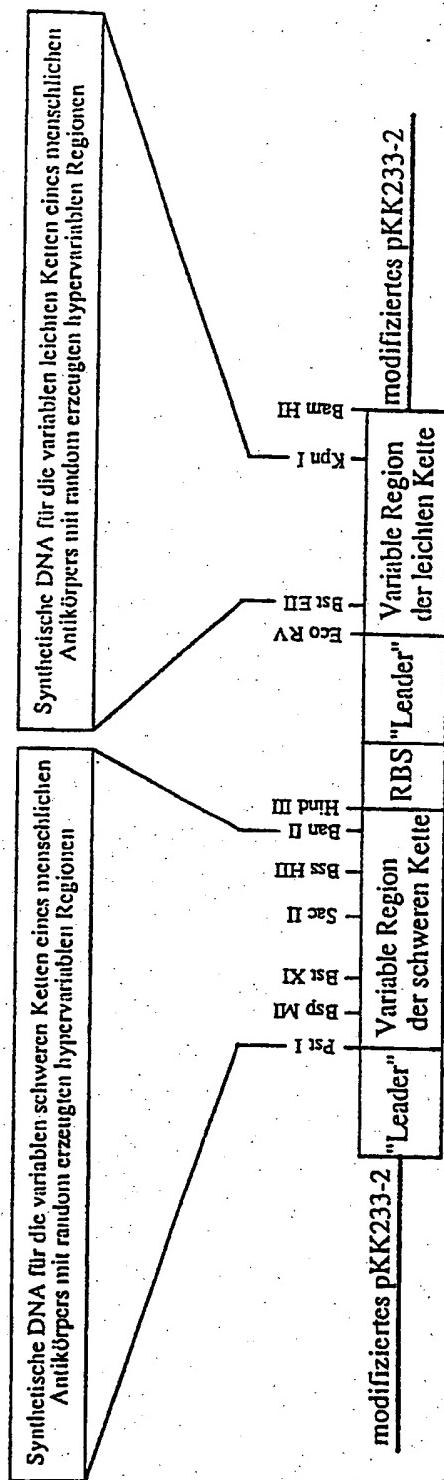
25

40

46

50

Insertion der Antikörperbibliotheken in den Expressionsvektor pFMT



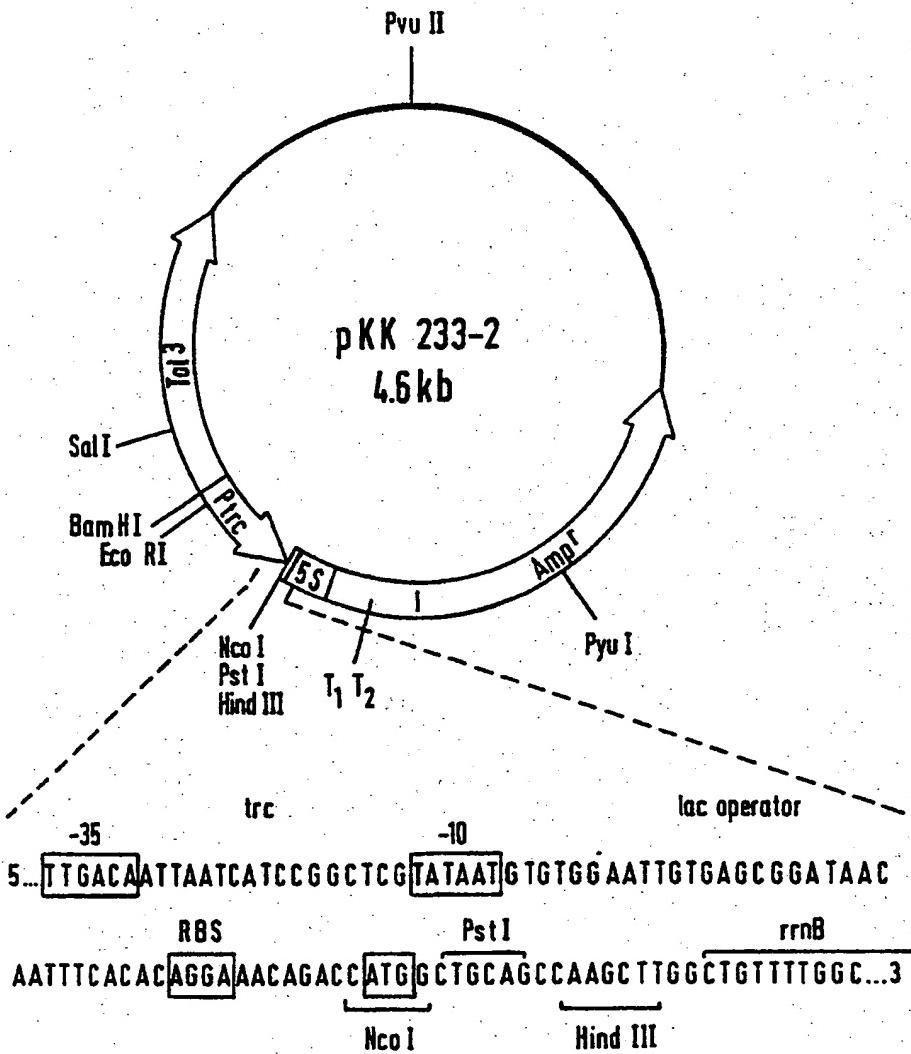
55 Patentansprüche

1. Synthetische Human-Antikörper-Bibliotheken, erhältlich durch Generierung von Zufallssequenzen für die hypervariablen Bereiche unter den Einschränkungen (a) bis (e), Satz A oder Satz B gemäß Tab. 1

- und anschließendem Einbau in einen Expressionsvektor.
2. Synthetische Human-Antikörper-Bibliotheken nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die generierten Zufallssequenzen für die hypervariablen Bereiche vor dem Einbau in einen Expressionsvektor amplifiziert werden.
 - 5 3. Synthetische Human-Antikörper-Bibliotheken nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die modifizierten Vektoren M13mp18HuVhlys und M13mp18HuVllys eingesetzt werden.
 - 10 4. Synthetische Antikörper-Bibliotheken nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Expressionsvektor der Vektor pFMT eingesetzt wird.
 - 15 5. Verfahren zur Herstellung synthetischer Human-Antikörper-Bibliotheken, dadurch gekennzeichnet, daß für die hypervariablen Bereiche Zufallssequenzen unter den Einschränkungen (a) bis (e), Satz A oder Satz B gemäß Tab. 1 erzeugt und anschließend in einen Expressionsvektor eingebaut werden.
 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die erzeugten Zufallssequenzen vor Einbau in einen Expressionsvektor amplifiziert werden.
 - 20 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Expressionsvektor der Vektor pFMT eingesetzt wird.
 8. Verfahren zur Isolierung von Klonen, die spezifische humane Antikörper sezernieren, dadurch gekennzeichnet, daß synthetische Human-Antikörper-Bibliotheken nach Anspruch 1 bis 4 mit spezifischen Antigenen durchsucht werden.
 - 25 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein Markerpeptid, vorzugsweise die "TAG"-Sequenz eingebaut wird und die gesuchten Klone mit Antikörpern gegen das Markerpeptid, vorzugsweise mit dem Antikörper YL 1/2 identifiziert werden.
 - 30 10. Verwendung von synthetischen Human-Antikörper-Bibliotheken nach Anspruch 1, 2 oder 3 zur Isolierung von Klonen, die spezifische Antikörper sezernieren.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : ES

- 35 1. Verfahren zur Herstellung synthetischer Human-Antikörper-Bibliotheken, dadurch gekennzeichnet, daß für die hypervariablen Bereiche Zufallssequenzen unter den Einschränkungen (a) bis (e), Satz A oder Satz B gemäß Tab. 1 erzeugt und anschließend in einen Expressionsvektor eingebaut werden.
- 40 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erzeugten Zufallssequenzen vor Einbau in einen Expressionsvektor amplifiziert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Expressionsvektor der Vektor pFMT eingesetzt wird.
- 45 4. Verfahren zur Isolierung von Klonen, die spezifische humane Antikörper sezernieren, dadurch gekennzeichnet, daß synthetische Human-Antikörper-Bibliotheken hergestellt nach Anspruch 1 bis 3 mit spezifischen Antigenen durchsucht werden.
- 50 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein Markerpeptid, vorzugsweise die "TAG"-Sequenz eingebaut wird und die gesuchten Klone mit Antikörpern gegen das Markerpeptid, vorzugsweise mit dem Antikörper YL 1/2 identifiziert werden.



31